第32卷 第4期 昆 虫 学 报 Vol. 32, No. 4
1989年11月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Nov., 1989

神经毒性杀虫药剂对家蝇头部环腺苷酸含量的影响

马 燕 张宗炳
(北京大学生物学系,北京)

摘要 本文报道用七类20种神经毒性杀虫药剂处理家蝇(*Musca domestica vicina*),发现引起环腺苷酸(cAMP)增加的药剂有:DDT、菊酯类和甲脒类,而BHC、狄氏剂、有机磷、氨基甲酸酯、沙蚕毒素均没有影响。并做了DDT、溴氰菊酯和杀虫脒中毒0—8小时内cAMP变化的时间曲线,以及DDT中毒0—8小时内腺苷酸环化酶(ACE)活性的时间曲线。结果表明:DDT中毒1小时引起cAMP达一峰值,2小时后回到原位;2—8小时内持续而缓慢的上升;乙酰胆碱酯酶活性曲线与此基本一致,但2—8小时内活性增加不大。溴氰菊酯中毒引起cAMP变化的时间曲线与DDT的基本一致,只是第二次cAMP上升更高一些。杀虫脒引起cAMP的时间变化曲线是0.5小时达一峰值,1小时基本回到原位,2—4小时有一个上升较快、较高的峰。我们认为,DDT引起cAMP值的第一次上升是激活了ACE造成的,第二次上升可能与钙调蛋白和磷酸二酯酶有关。杀虫脒引起cAMP值上升,是因为激活了章鱼胺激性的ACE。

关键词 家蝇 环腺苷酸 腺苷酸环化酶 章鱼胺

环腺苷酸(cAMP)作为第二信使在动物神经传导和激素调节的研究中受到广泛重视。激素或神经递质首先与细胞膜表面的受体结合,改变与受体偶联的乙酰胆碱酯酶活性,从而改变cAMP的浓度,影响蛋白质磷酸化,以调节细胞的代谢和其他功能(Nathanson, 1977; Bodnaryk, 1983)。七十年代初,有人报道有机氯能使小鼠肾功能衰退和肝坏死。在这个过程中,内源性cAMP升高,并伴随着ACE活性的增加(Kacew等,1973)。也发现一些神经毒剂与cAMP有关。毒杀芬使蜚蠊头部、马氏管、脂肪体和生殖腺等各部位的cAMP升高(Butter等,1977)。5-羟色胺体外处理红头丽蝇的唾液腺,半分钟后即引起cAMP的增加(Heslop等,1980)。张宗炳等(1985)在研究DDT对酪氨酸脱羧酶的诱导现象时,发现诱导过程伴随着cAMP的增加。罗远等(1987)进一步证明,用溴氰菊脂处理家蝇时,酪胺、酪氨酸脱羧酶和cAMP都有增加。因此,搞清神经性杀虫药剂与cAMP之间的关系,不仅有助于阐明这些神经毒剂的毒理机制,并能帮助我们了解cAMP在昆虫神经系统中的正常功能。

本文对常用的七类神经毒性杀虫药剂是否影响家蝇头部cAMP的含量做了较全面的测定。结果表明:DDT中毒2小时以内,cAMP的变化与ACE的激活相平行,但以后ACE活性的微小上升不是cAMP再次上升的主要原因。溴氰菊酯影响cAMP的时间曲线与DDT的基本一致,再次证实了溴氰菊酯的毒理机制与DDT的相似性。杀虫

本文于1987年7月收到。

脒对章鱼胺受体有作用，激活了 ACE，因此使 cAMP 增加。它的代谢物去甲杀虫脒在杀虫脒处理后 4 小时内产生，引起第二次 cAMP 的上升，它是章鱼胺受体更强烈的激活剂。

材料与方法

一、实验昆虫

家蝇成虫 (*Musca domestica vicina*)，27℃ 恒温实验室培养。

二、主要试剂及仪器

cAMP 药箱，中国医学科学院基础医学研究所；99% DDT 晶体、99% 西维因晶体、80% 涕天威晶体，中国科学院动物研究所；99% 溴氰菊酯晶体，法国 UCLAF；52.3% 速灭菊酯乳剂、93% 丙烯菊酯乳剂、90% 二氯苯醚菊酯乳剂，日本住友化学公司；86% 杀虫脒固体，北京第二农药厂；双甲脒、单甲脒、杀螨脒、甲脒代谢物均为纯品，浙江工学院化工系；99% BHC 晶体、20% 狄氏剂固体，重庆化学试剂公司；E605 原油、1059 原油，Bayer 公司；40% 乐果乳剂，农科院植保所；95% 敌百虫晶体，上海红卫化工厂；50% 巴丹水溶粉剂，日本武田工业株式会社；86.5% 杀虫双晶体，南开大学有机元素研究室。LS 9800 液体闪烁计数仪，Backman 公司。

三、实验方法

1. 除巴丹、甲脒类以蒸馏水为溶剂外，其他药剂均以丙酮为溶剂。

2. 药剂处理及 cAMP 匀浆制备

每 10 头雌性成虫为一组，乙醚麻醉，分别点以 1μl 各种药剂(浓度见表 1) 于前胸背板处，立即放入正常饲养环境中。一定时间后投入液氮固定，取家蝇头部入匀浆器，加 0.5 ml 15% 三氯乙酸在冰浴中匀浆 5—7 分钟，以 3000 转/分离心 10 分钟。上清液用 4 倍体积的水饱和乙醚洗 3—4 次，70℃ 水浴蒸干乙醚。测定时用 1ml 磷酸缓冲液溶解，4℃ 保存备用。

3. cAMP 的测定

标准 cAMP 或样品分别加入 ^{3}H-cAMP 和蛋白激酶，在 4℃ 温育 3 小时。反应后加吸附剂，以 3000 转/分离心 20 分钟。上清液加入闪烁液测定，进一步求出结合率 (C_X/C_T)。以 C_X/C_T 对不同浓度的标准 cAMP 做标准曲线，通过测定样品的 C_X/C_T 值，可在标准曲线上读出相应的 cAMP 的含量 (pmol/50μl)。

4. DDT 诱导 ACE 活性的测定

利用 ACE 催化腺苷三磷酸 (ATP) 分解为 CAMP 和 ppi 的反应，我们用单位时间内生成的 cAMP 量表示 ACE 的活性。具体步骤如下：

每10头雌性家蝇为一组，用 DDT 在背板上点滴，分别在 0.25、0.5、1、2、4、8 小时后投入液氮。取家蝇头部入匀浆器中，加 0.5ml Tris-苹果酸缓冲液匀浆 3—5 分钟。转入小烧杯里，磁力搅拌下取 400μl 匀浆液放入试管里，加 10mol/L 的 ATP 50μl，置 30℃ 下水浴 5 分钟，立即转入 100℃ 水浴 3 分钟以上，冷却后以 3000 转/分离心 5 分钟。4℃ 保存备用。

生成的 cAMP 测定方法如前所述。

表 1　几种药剂处理后 cAMP 处理组/正常组比值一览表

药名	用药浓度 (mg/ml)	cAMP 处理组/正常组
DDT	5×10	3.17
溴氰菊酯	1×10^{-3}	2.55
速灭菊酯	1×10^{-1}	2.27
丙烯菊酯	5×10^{-2}	2.27
二氯苯醚菊酯	5×10^{-2}	2.64
杀虫脒	1×10	3.15
单甲脒	5×10	2.61
杀螨脒	2.5×10	2.72
甲脒代谢物	5.0×10	2.02

结果与讨论

一、20 种药剂处理 1 小时后 cAMP 含量的改变

在半对数坐标纸上，以结合百分数 C_X/C_T 为纵坐标，以标准 cAMP 浓度 (pmol/50 μl) 为横坐标，作出标准曲线。根据各样品的 C_X/C_T 的值，可从标准曲线上查得相应的 cAMP 的量 (pmol/50μl)，再计算出处理组与正常组的比值。表 1 列出了能引起 cAMP 改变的几种药剂。

其他杀虫药均无显著影响，它们是 BHC、狄氏剂、有机磷 (E605，1059、乐果、敌百虫)、氨基甲酸酯(西维因、涕灭威)、沙蚕毒素(巴丹、杀虫双)和双甲脒。

从表 1 可以看出，药剂处理 1 小时后，DDT、菊酯类和甲脒类可使家蝇头部 cAMP 的量增加到原来的 2—3 倍。双甲脒对 cAMP 没有作用，这是个特殊结果。Hollingworth 等(1984)报道，它也能引起 cAMP 的增加，它的杀虫机制与杀虫脒相同，但对产生 cAMP 的反应不同，这一点值得进一步研究证实。

这需指出的是，因巴丹和杀虫双结果有时有出入，有几次引起 cAMP 处理组与正常组的比值分别达到 2.78 和 1.85。我们没有把这一类归入有影响的药剂之列，但不能肯定它们对 cAMP 没有影响。巴丹和杀虫双是占领乙酰胆碱受体的杀虫药剂，有实验证明，环鸟苷酸 (CGMP) 与蕈毒型的乙酰胆碱受体的传导有关 (Wastek, 1981)。因此，是否它们对 CGMP 有影响，也有待证实。

二、DDT 引起 cAMP 改变的机制

用 DDT 点滴家蝇背部，分别在 0.25、0.5、1、2、4、8 小时后取样。经测定计算，绘出 DDT 引起 cAMP 改变的时间曲线(见图 1)，通过类似步骤绘出图 2 (DDT 诱导的 ACE 活性时间曲线)。比较图 1 和图 2 我们不难看出，cAMP 的第一次上升与下降，与 ACE 活性的增减在时间上恰好一致，即在 0—2 小时内，cAMP 的增减是由于 ACE 活性的增减造成的。ACE 活性可能与酪胺及章鱼胺的积累有关。张宗炳等(1984)报道，DDT 能使蜚蠊体内酪胺和 cAMP 同时增加。罗远等(1987)也报道了溴氰菊酯能引起家蝇头部酪胺和 cAMP 的增加，并证明 DDT 及溴氰菊酯诱导了酪氨酸脱羧酶的活性，这是使酪胺增加的原因。酪胺产生后很快就 β-羟化成章鱼胺，而酪胺与章鱼胺都是章鱼胺受体的激活剂 (Hollingworth, 1984)。它们激活了章鱼胺受体，造成 ACE 活性增加，于是

cAMP 上升。但是2—8小时内 cAMP 第二次上升原因不明，至少可以说与 ACE 关系不大。有可能涉及到磷酸二酯酶、钙离子和钙调蛋白等。有报道说，DDT 能抑制钙调蛋白

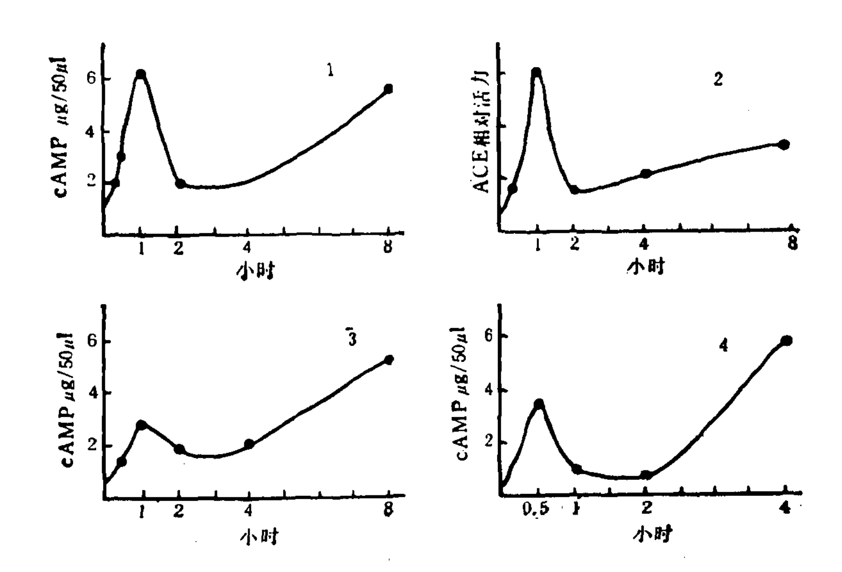


图1 DDT 引起 cAMP 改变的时间曲线　　图2 DDT 诱导 ACE 活性的时间曲线

图3 溴氰菊酯引起 cAMP 改变的时间曲线　　图4 杀虫脒引起 cAMP 改变的时间曲线

对磷酸二酯酶的激活作用（Matsumura, 1985）。磷酸二酯酶是分解 cAMP 的，它的不活化必然也会使 cAMP 增加。另外也有人报道，钙离子参与神经膜上 DDT 受体的调节过程（Plapp, 1983），这些方面的具体机制还不明确。

三、溴氰菊酯与 DDT 的一致性

用溴氰菊酯点滴家蝇背部，分别在 0.25、0.5、1、2、4、8 小时后取样，经测定计算，绘出溴氰菊酯引起 cAMP 改变的时间曲线(见图 3)。比较图 1 和图 3，溴氰菊酯影响 cAMP 改变的时间曲线与 DDT 的基本相似，只是第二次上升比第一次高，这可能是溴氰菊酯作用更强的表现，也可能是溴氰菊酯本身能抑制磷酸二酯酶的原因。我们的结果再次证实了溴氰菊酯与 DDT 的相似性。Plapp 的实验(1983)甚至证明了 DDT 和溴氰菊酯作用在同一受体上，只是受点位置不同。

四、杀虫脒影响 cAMP 改变的机制

用杀虫脒点滴家蝇背部，分别在 0.25、0.5、1、2、4 小时后取样，经测定计算，绘出杀虫脒引起 cAMP 改变的时间曲线(见图 4)。杀虫脒引起 cAMP 改变的机制与 DDT 并不相同。

章鱼胺是昆虫体内重要的生物活性物质，它具有神经递质、神经调节因子和神经激素三重作用。有实验证明，杀虫脒在昆虫体内大约 4 小时内完全代谢成去甲杀虫脒· 二者都能模仿章鱼胺的作用，而且去甲杀虫脒的作用来得更快更持久（Hollingworth, 1980: Evans, 1980）。章鱼胺受体激活时可以使 ACE 增加活性，所以说杀虫脒和去甲杀虫脒都是章鱼胺激性的 ACE 的激活剂(Hollingworth, 1984)。因此杀虫脒引起 cAMP 的增加，主要是 ACE 激活的结果。cAMP 第一次上升是杀虫脒引起的，第二次上升则是去甲

杀虫脒引起的。因为：1. 第二峰是在处理 2—4 小时时产生的，这段时间正好是杀虫脒代谢为去甲杀虫脒所需的时间。2. 第二峰比第一峰高得多，这一点与去甲杀虫脒比杀虫脒作用更强相吻合。章鱼胺激性的 ACE 激活后，使 cAMP 增加。

五、小结

DDT、菊酯类与甲脒类杀虫药剂均引起 cAMP 改变，改变的情况大致相似，但实际机制并不完全相同。DDT 引起 cAMP 的第一次上升与酪胺及章鱼胺的产生和积累有关。第二次上升的原因不明，可能涉及磷酸二酯酶的抑制作用。溴氰菊酯的情况基本上与 DDT 相同。杀虫脒引起 cAMP 的第一次上升与杀虫脒本身有关，第二次上升与去甲杀虫脒有关。两者相同的地方是均涉及到章鱼胺受体。

参　考　文　献

张宗炳　1983　杀虫药剂的分子毒理学。北京大学出版社。

张宗炳　1984　各种神经毒剂引起毒素的产生。昆虫学报 **27**(2):165。

张宗炳等　1985　DDT 对美洲蜚蠊 L-酪氨酸脱羧酶的诱导作用。昆虫学报 **23**(3):241。

张宗炳等　1986　昆虫在物理及化学压力下产生的神经活性物质。昆虫学报 **29**(3):337。

罗　远等　1987　溴氰菊酯中毒引起家蝇神经系统 cAMP 含量的改变。昆虫学报 **30**(1):8。

Bodnaryk, R. P. 1982 The effect of single and combined doses of Chlordimeform and Permethrin on cAMP and cGMP levels in the moth, *Mamestra configurata* Walker. *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**: 334.

Butler, K. D. & L. A. Crowder 1977 Increased cyclic nucleotides in several tissues of the cockroach and mouse following treatment with toxaphene. *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**: 474.

Evans, P. D. & J. D. 1980 Action of formamidine pesticides on octopamine recepter. *Nature* **287**: 60.

Heslop, J. P. & M. J. Berridge 1980 Changes in cyclic AMP and GMP concentrations during the action of 5-hydroxytryptamine on an insect salivary gland. *Biochem. J.* **192**: 247.

Hollingworth, R. M. & L. L. Murdock 1980 Formamidine pesticides: Octopamine-like action in a firefly. *Science* **209**: 74.

Kacew, S. & R. L. Singhal 1973 The infuluence of P. p'-DDT, α-Chlordane, Heptachlor and Endrin on hepatic and renal carbohydrate metabolism and cyclic AMP adenyl cyclase system. *Life Science*, **13**: 1363.

Matsumura, F. 1985 Interaclion of DDT and pyrethroids with calmodulin and its significance in the expression of enzyme activities of phosphodiesterase. *Biochem. Pharm.* **34**: 1689.

Nathanson, J. A. 1977 Cyclic nucleotides and nervous system function. *Physiol. Rev.* **57**: 157.

Plapp, F. W. 1983 DDT and pyrethroids: Receptor binding and mode of action in the housefly. *Pestic. Biochem. Physiol.* **20**: 76.

Wastek, G. J. & J. R. Lopez 1981 Demonstration of a muscarinic receptor-mediated cyclic GMP-dependent hyperpolarization of the membrane potential on mouse neuroblastoma cells using [^{3}H] tetraphenyl-phosphonium. *Mol. Pharmacol.* **19**: 15.

THE EFFECT OF NEUROTOXIC INSECTCIDES ON THE cAMP LEVEL IN HOUSEFLY BRAINS

Y. MA J. T. CHANG

(Department of Biology, Peking University, Beijing)

Neurotoxic insecticides affect the level of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) in nervous tissues of insects. Three categories of insecticides among the seven we used stimulated the production of cAMP in the heads of housefly: DDT, pyrethroids (Deltamethrin, Sumicidin, Allethrin, Permethrin) and form-amidines (Chlordimeform, Dan-jia-mi, DCPM and a metabolite of Chlordimeform). But BHC, Dieldrin, organophosphorus compounds (Parathion, Systox, Dimethoate, Trichlorfon), carbamates (Carbaryl, Aldicarb) and nereistoxin (Padan, Sha-chong shuang) had little effects. The time courses of the change in cAMP contents after treatments with DDT, Deltamethrin and Chlordimeform were studied. We also investignted the time course of adenylate cyclase (ACE) activity during DDT poisoning. The results showed: (1) DDT caused an rise and fall in cAMP content within 2 hours. The rise and fall ran parallel with the induction curve of ACE activity. In 2-8 hours, cAMP showed a second slower rise, but an obvious change of ACE activity was not observed. (2) Deltamethrin showed the same changs as DDT, except that the second rise of cAMP was even more prominent. (3) Chlordimeform also caused a rise and fall of cAMP level within 1 hr. In 2-4 hrs, a second and more prominent rise occurred.

The biphasic change of cAMP content after treatment with DDT, and Deltamethrin was due to the induction of tyrosine decarboxylase, resulting in the formations of tyramine which consequently β-hydroxylated to octopamine; both of them activated ACE. The second rise seemed to have little relation with ACE and might be the results of inhibition of phosphodiesterase. The first rise of cAMP content after Chlordimeform treatment was caused by Chlordimeform itself, while the second rise was caused by its metabolite, desmethyl-Chlordimeform, which had greater effect. Chlordimeform and desmethyl-Chlordimeform are both agonists of the octopaminergic ACE.

Key words *Musca domestica* vicina——cyclic AMP——adenylic cyclase——octopamine